

MATERIEL BIOLOGIQUE A BASE DE LEISHMANIES ET PROCEDE
POUR LA PRODUCTION DE VACCINS ANTI-LEISHMANIENS

L'invention concerne un matériel biologique à base de leishmanies et un procédé pour la fabrication de ce matériel biologique et, à partir de celui-ci, de vaccins pour l'immunisation de mammifères contre des leishmanies ou les maladies dont elles sont la cause, les leishmanioses. Elles se manifestent par des lésions cutanées, cutanéomuqueuses ou viscérales, qui s'échelonnent entre des formes bénignes et les formes léthales.

Les leishmanies ont en commun d'exister sous deux formes distinctes, notamment les formes promastigotes et les formes amastigotes. Les formes promastigotes se développent à la température de 24°C dans le tube digestif des insectes qui en sont les vecteurs, les phlébotomes, ou encore dans des milieux de cultures appropriés. En revanche ces parasites se présentent sous les formes distinctes, dites amastigotes (formes intracellulaires des leishmanies) chez les mammifères à sang chaud auxquels le parasite a été transmis, par la piqûre du phlébotome ou par le contact avec d'autres mammifères déjà infectés. Ces formes amastigotes se développent préférentiellement dans des cellules mononucléées de ces mammifères, notamment dans les macrophages et monocytes. L'infection peut également être provoquée dans de telles cellules maintenues en culture et à la température du corps du mammifère dont elles sont issues, notamment à $38 \pm 2^\circ\text{C}$. L'infection peut être induite expérimentalement soit dans des cellules de ce même mammifère, soit dans des cellules d'un autre animal d'expérience, par exemple la souris.

La grande diversité des leishmanies a été rappelée dans la demande de brevet européen n° 85904647.6/0197062. Néanmoins il a été montré dans cette demande que les différentes espèces de leishmanies possédaient des

déterminants antigéniques communs permettant la préparation de compositions de vaccins susceptibles d'exercer un effet protecteur in vivo contre ces diverses espèces, en d'autres termes d'induire chez l'hôte auquel ils peuvent être administrés l'acquisition d'une immunité globale, par conséquent également une protection globale contre les différentes leishmanioses cutanées, cutanéomuqueuses et viscérales de l'Ancien et du Nouveau Monde.

La demande de brevet européen décrit également des anticorps monoclonaux capables de reconnaître ces antigènes communs et un procédé de sélection des hybridomes sécréteurs de ces anticorps monoclonaux. On rappelle que ceux-ci sont caractérisés par leur capacité à inhiber l'infection de cellules sarcomateuses par les formes promastigotes de une ou plusieurs espèces de *Leishmania*, lorsque ces cellules sarcomateuses sont mises en contact avec lesdites formes promastigotes pré-incubées avec ces anticorps monoclonaux dans des conditions qui, en l'absence desdits anticorps monoclonaux, conduiraient à une préparation parasitaire élevée dans lesdites cellules.

Deux hybridomes capables de sécréter de tels anticorps monoclonaux ont été déposés à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes de l'Institut Pasteur de Paris (CNCM), respectivement sous les n° I-344 et I-345, le 1er octobre 1984. Ces anticorps monoclonaux se sont révélés capables d'inhiber le cycle d'évolution des leishmanies in vivo. Ils ont également permis d'identifier des antigènes de poids moléculaires 113, 70 et 40 kilodaltons (kDa) susceptibles de conférer une immunité globale susmentionnée à des hôtes vaccinés.

On a également décrit dans cette demande de brevet européen des fractions antigéniques, dénommées F_2 , F_5 et F_6 , qui ont été obtenues à partir de lysats de *L. infantum*. Ces fractions, contiennent des protéines comprises

dans des plages de poids moléculaires, respectivement de
94-67 kDa,
30-30 kDa et
inférieures à 20 kDa.

5 Ces fractions ont déterminé un état d'immunoprotection
contre plusieurs espèces de leishmanies, chez des souris
BALB/c et C57BL/6 auxquelles elles avaient été préala-
blement injectées.

10 Ces fractions immunisantes avaient été obtenues
par électrophorèse préparative sur gel d'acrylamide de
lysats de promastigotes de L. infantum, responsable de
leishmaniose viscérale. Il a été montré que des fractions
d'antigènes (PM = 94-67 kDa) dérivant de L. major
15 (responsable de leishmaniose cutanéomuqueuse ou cutanée)
étaient aussi efficaces que ceux de L. infantum pour
induire une immunoprotection dans un modèle murin.

La technique par électrophorèse préparative sur
gel d'acrylamide présente un certain nombre d'inconvé-
nients : d'une part, les antigènes isolés peuvent contenir
20 de l'acrylamide, substance qui, à forte dose et sous forme
non polymérisée, est potentiellement neurotoxique ;
d'autre part, la méthode n'est pas assez productive pour
la préparation de vaccins à l'échelle industrielle.

En outre les promastigotes de L. infantum, ayant
25 fourni les lysats à partir desquels ont été obtenues les
fractions F₂, F₅ et F₆, avaient été obtenus à partir de
cellules sarcomateuses "TG180" décrites par SARTORELLI
A.C. et BOTH B.A. (1961), Federation Proceedings, 20,
156-159. Les conditions de cette production et de l'iso-
lement des leishmanies décrites ont été décrites par L. M-
30 ONJOUR et Coll. dans l'article intitulé "Rapid, Large-
Scale Production and Isolation for Leishmania Amasti-
gotes", Annals of Tropical Medicine Parasitology (1984),
78, 423-425.

35 Or l'on sait les réserves que suscitent chez les

cliniciens et les responsables de la Santé Publique, des principes actifs de médicament obtenus à partir de cellules tumorales, même lorsque l'on peut établir que la purification de ces principes actifs a été poussée à l'extrême. A l'inconvénient qui précède, il s'en ajoute encore un autre : le caractère souvent non reproductible, tant en composition qu'en activité immunogène des fractions obtenues à partir de promastigotes co-cultivées avec ces cellules sarcomateuses.

Le but de l'invention est donc de fournir des moyens et un procédé permettant de remédier aux inconvénients qui ont été mentionnés, plus particulièrement de fournir des milieux constituant autant de sources d'antigènes protecteurs, qui soient essentiellement exempts des constituants critiqués susmentionnés et qui, de plus, permettent la production d'antigènes ayant des compositions et activités essentiellement reproductibles.

Le caractère reproductible des compositions et des activités des antigènes vaccinaux a été acquis grâce à une première disposition de l'invention, en traitant une matière première constituée par une population de leishmanies dont la totalité des parasites étaient virulents ou infectieux à l'égard de cultures cellulaires normalement sensibles et provenant d'un mammifère lui-même sensible à l'infection par ces leishmanies. En d'autres termes, ces populations de leishmanies sont dépourvues des proportions très variables de leishmanies ayant perdu leur caractère de virulence, que l'on observe dans les cultures classiques de ces parasites.

L'invention concerne donc plus particulièrement un matériel biologique pour la production de vaccins anti-leishmaniens comprenant une population de leishmanies répondant aux conditions qui viennent d'être indiquées.

L'invention fournit également un procédé de production d'un tel matériel biologique, ce procédé étant

caractérisé par l'incubation d'une culture de cellules provenant normalement du même mammifère que le mammifère auquel les vaccins antileishmaniens sont destinés, notamment de macrophages ou de monocytes, en présence d'une population de leishmanies pathogènes à l'égard de ce mammifère dans des conditions et à une température, notamment de 37 à 39°C, autorisant l'infection des cellules de cette culture par ces leishmanies, la séparation du milieu de culture et le lavage des cellules pour assurer l'élimination de toutes leishmanies extracellulaires, la récupération des cellules contenant pratiquement exclusivement les cellules infectieuses à l'égard du mammifère concerné, et l'amenée de ces cellules à une température, notamment par congélation, permettant la conservation des parasites infectieux.

Un tel matériel biologique est donc constamment disponible à l'emploi. Les parasites peuvent être récupérés, notamment après décongélation et, le cas échéant, après un traitement complémentaire de rupture ou de lyse des cellules. Ces parasites peuvent ensuite être mis en culture, notamment à des fins d'amplification, dans des conditions et sous une température, notamment de l'ordre de 24°C, permettant leur multiplication à l'état promastigote. Cette culture peut être effectuée, soit dans un milieu cellulaire, soit dans un milieu acellulaire.

Il a été constaté que, selon l'invention, il était possible d'obtenir, à partir de ces populations de leishmanies ainsi sélectionnées et après lyse de celles-ci, des fractions vaccinales actives dans les mêmes plages de poids moléculaires que celles qui ont été évoquées dans la demande de brevet européen identifiée plus haut. Ces fractions actives sont accessibles par tout procédé de séparation physique de constituants d'après leur poids moléculaire, par exemple par filtration sur des tamis moléculaires choisis selon les gammes de poids moléculaires à

séparer à partir du milieu initialement traité.

Il sera remarqué que dans le procédé selon l'invention, qui a été décrit plus haut, la sélection est opérée au niveau de la capacité des leishmanies virulentes à infecter les cellules mises en oeuvre et de l'élimination des cellules non infectantes. En d'autres termes, la population de leishmanies selon l'invention est essentiellement constituée de leishmanies dérivées de formes intracellulaires ou amastigotes de leishmanies. Il peut encore être mentionné que la pureté des populations de parasites conformes à l'invention peut être vérifiée par leur capacité à pénétrer dans des cellules sensibles, lorsque ces parasites sont incubés au contact de ces cellules, dans des conditions autorisant cette infection, notamment à une température de 37 à 39°C. Le caractère infectieux ou virulent des leishmanies des matériels biologiques de l'invention est encore caractérisé par la capacité de ces leishmanies à pénétrer dans des monocytes en culture, notamment lorsqu'elles sont à l'état promastigote. On remarquera d'ailleurs que ces tests constituent également autant de moyens permettant, le cas échéant, de repurifier la population de leishmanies ultérieurement à la mise en oeuvre pour la production de vaccins, puisque celles des leishmanies qui auraient éventuellement perdu leur caractère de virulence pourraient à l'occasion de ces tests être éliminées, par simple lavage des cellules infectées.

Les cellules ainsi infectées constituent l'une des formes préférées du matériel biologique selon l'invention. Il peut être conservé à l'état congelé, par exemple dans l'azote liquide ou le dioxyde de carbone liquide, le cas échéant en présence de proportions adéquates d'un agent de conservation, tel que la glycérine ou le diméthyl-sulfoxyde, dans des conditions bien connues de l'homme du métier. Bien entendu, les lignées cellulaires utilisées pour

ces cultures devront être constituées par des lignées de sujets sans antécédents leishmaniens et dépourvues de tout autre antigène indésirable, par exemple de l'antigène d'enveloppe du virus de l'hépatite B, d'antigènes et/ou d'anticorps anti-HIV.

L'invention concerne naturellement aussi toute autre forme de matériel biologique contenant lesdits parasites. Ce matériel biologique peut être constitué par les parasites à l'état purifié, lesquels peuvent éventuellement être conservés sous forme réfrigérée, le cas échéant en présence de protéines assurant leur conservation. Il peut encore être constitué par le milieu cellulaire dans lequel il aura été cultivé à l'état promastigote (notamment à une température de 24°C), dans le but d'en fabriquer des quantités plus importantes. Bien entendu le matériel biologique peut encore être constitué par un milieu acellulaire contenant les agents nutritifs adéquats permettant la multiplication des parasites dans un milieu acellulaire. Des exemples de tels milieux sont indiqués de façon non limitative dans les exemples envisagés plus loin.

Les parasites récupérés à partir de ce matériel biologique peuvent ensuite être lysés, par exemple dans les conditions qui ont été indiquées dans la demande de brevet européen. Une fraction, dont les caractéristiques d'efficacité immunogène se révèlent particulièrement homogènes pour tous parasites appartenant au genre *Leishmania*, est constituée par les fractions de poids moléculaires contenus dans la plage de 94 kDa à 67 kDa, et ce quelle que soit la nature du parasite mis en oeuvre.

A cet égard, il convient de remarquer que l'invention s'applique également à la production de fractions vaccinales obtenues à partir de mélanges de parasites appartenant à des espèces différentes.

De même l'invention permet la préparation d'autres

fractions immunogènes efficaces, notamment par séparation à partir de lysats de populations de leishmanies conformes à l'invention des poids moléculaires contenus dans la plage de 20 kDa à 30 kDa ou encore de fractions dont les poids moléculaires ne dépassent pas 20 kDa.

L'invention met par conséquent à la disposition des spécialistes un matériel biologique pouvant être utilisé en tant que stock normalisé ou standard de leishmanies dans des lignées cellulaires dépourvues de tout caractère tumorigène. Il est naturellement clair que le choix des lignées cellulaires utilisées doit normalement provenir du même mammifère que celui qui est à vacciner, par exemple monocytes ou macrophages de chien, dans le cas de la vaccination canine, ou monocytes humains, dans le cas de la vaccination humaine.

La qualité de l'immunoprotection qui peut être obtenue à l'aide de fractions d'antigène obtenues à partir de telles populations de leishmanies sera illustrée dans les exemples qui suivront.

Selon un autre aspect encore de l'invention, celle-ci peut être mise en oeuvre pour évaluer l'efficacité d'une vaccination antileishmanienne chez un mammifère, tel que l'homme ou le chien, ce procédé étant caractérisé par la mise en contact avec des leishmanies infectieuses de cellules prélevées chez le mammifère vacciné, ces cellules étant choisies parmi celles, notamment macrophages ou monocytes, qui seraient sensibles à l'infection en cas de vaccination inefficace, dans des conditions et à une température qui autoriseraient normalement l'infection de ces cellules, et par la détection dans ces cellules de la présence d'une infection par lesdites leishmanies.

L'absence de détection d'une infection dans les cellules démontre alors une immunoprotection satisfaisante, tandis que la détection d'une infection démontre

l'inefficacité de la vaccination effectuée antérieurement.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'exemples d'obtention du matériel biologique selon l'invention et des conditions dans lesquelles il peut être utilisé. Il va de soi que ces exemples ne revêtent aucun caractère limitatif. On remarquera en particulier que le procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre avec toutes autres espèces de leishmanies, en particulier celles qui ont été identifiées de façon plus spécifique dans la susdite demande de brevet européen.

EXEMPLE I

1. Production de cultures de monocytes parasités

1.1. 2 volumes de sang prélevés sur héparine sont mélangés avec 2 volumes de milieu RPMI 1640 (+ gentamycine), puis déposés sur 2 volumes d'un milieu de Ficoll-métrizoate, placés dans un tube conique. La couche de cellules mononuclées est recueillie après une centrifugation à 900 g pendant 20 minutes, à température ambiante et les cellules sont lavées 3 fois en RPMI (3 x 900 g/7 minutes).

Elles sont ajustées ensuite à une concentration de 2×10^5 cellules μ l de RPMI et ensemencées dans une boîte de Pétri (dimensions de 35 x 10 mm) en plastique.

En variante, à des fins expérimentales et si l'on utilise des souris, on injecte 5 ml de RPMI dans la cavité péritonéale de ces animaux. Après aspiration, le liquide obtenu est déposé dans un tube contenant 2 à 5 ml de RPMI. 3 centrifugations et lavages permettent de recueillir un culot de cellules dont 2×10^5 à 5×10^5 seront réparties dans une boîte de Pétri en plastique.

1.2. Quelle que soit la variante initialement adoptée, on ajoute alors 1 ml de RPMI et l'on soumet le contenu des boîtes à une incubation à 37°C pendant 2 heures, dans une atmosphère contenant 5 % de CO_2 , en

l'absence de sérum. L'adhérence des monocytes est alors obtenue. Le surnageant est alors éliminé et la couche cellulaire lavée 2 fois avec du RPMI.

5 1.3. 2 ml de RPMI, additionné de 20 % de sérum de veau foetal inactivé (SVF), sont alors ajoutés dans la boîte, placée à l'étuve à CO² (5 % CO²) à 37°C pendant 48 heures. Après 2 lavages de la couche de monocytes en RPMI et l'adjonction de 2 ml de RPMI + 20 % SVF contenant 10⁵ promastigotes, l'infection des cellules est évaluée après 10 4, 24, 48 et 72 heures, par exemple par observation au microscope des cellules préalablement colorées avec une solution de May-Grunwald-Giemsa. Les promastigotes extracellulaires ont auparavant été totalement éliminés par plusieurs lavages en RPMI.

15 1.4. Les monocytes parasités (formes amastigotes) et non parasités sont alors décollés à l'aide d'une spatule souple ("rubber policeman") ou par congélation - décongélation instantanée. Ils sont aliquotés et congelés dans une solution à 10 % de glycérol (technique classique). 20

A la demande, les cellules sont décongelées et déposées dans un milieu RPMI additionné de 10 % de SVF (100 UI pénicilline/ml / 100 µg streptomycine/ml) ; les parasites (formes promastigotes) issus des monocytes se multiplient en culture pendant 7 jours à 24°C. 25

Après centrifugation et lavages pour éliminer les résidus cellulaires, un repiquage des formes promastigotes actives, en milieu RPMI + 10 % SVF (24°C), permet d'obtenir après 8 à 12 jours, centrifugations et lavages, le stock de leishmanies nécessaires à la préparation du vaccin. 30

2. Protocole d'extraction des antigènes leishmaniens immunisants.

2.1. Parasites : Leishmania infantum ou toute autre espèce de leishmanie. 35

2.2. Promastigotes : obtenus à partir de la méthode décrite ci-dessus (choix de macrophages ou monocytes de souris, de chien ou d'homme en fonction de l'espèce à vacciner).

2.3. Préparation du lysat parasitaire :

Promastigotes lavés 3 fois en tampon PBS stérile.

Lyse de 100 mg (dosage des protéines) de culot parasitaire dans 2 ml du tampon suivant :

NP 40 0,5 % (v/v)

SDS 1 % (p/v)

Aprotinine 100 U/ml

EDTA 5 mM

PMSF (phényl-méthyl-sulfofluorure) 5 mM

Agitation à 4 C pendant 15 minutes.

2.4. Sonication :

3 sonications de 30 secondes avec une pause de même durée entre chaque sonication, le lysat étant maintenu à 0°C.

Centrifugation 5,000 g x 2 C x 10 minutes.

2.5. Préparation pour la chromatographie :

Aux 2 ml de surnageant de lysat, on ajoute 1 ml d'un tampon :

NP 40 0,5 %

Dithiothreitol 60 mM

EDTA 5 mM

PMSF 5 mM

Le mélange est incubé à 100°C pendant 5 minutes, puis immédiatement refroidi à 4°C avant d'être déposé sur une colonne de chromatographie remplie avec le tamis moléculaire commercialisé sous la désignation SEPHADEX G150 (marque enregistrée).

2.6. Chromatographie de partition sur gel de SEPHADEX G 150.

Le gel de SEPHADEX est équilibré dans le tampon

suivant :

	urée	4 M
	Tris-HCL, pH 8,0	50 mM
	DTT (dithiothreitol)	5 mM
5	EDTA	5 mM
	Aprotinine	100 U/ml
	PMSF	5 mM

Chromatographie à 4°C ; vitesse d'élution de 3 ml/cm²/h.

10 L'éluat recueilli avec un V_e/V_o de $1,22 \pm 0,10$ (densité optique 280 nm) est désigné LiUF2. Il contient essentiellement les antigènes de poids moléculaire 94-67 kDa extraits des parasites.

2.7. Dialyse et concentration :

15 La fraction LiUF2 est dialysée contre 100 volumes de tampon :

	EDTA	5 mM
	PMSF	0,1 mM

à 4°C pendant 24 à 36 heures, puis lyophilisée.

20 2.8. Dosage des protéines :

A l'aide du réactif connu sous la désignation BCA (Pierce Chem., ROCKFORD, Illinois, USA).

2.9. Variantes :

25 a) Chromatographie comme ci-dessus d'un lysat, mais non préalablement incubé à 100°C x 5 minutes.

b) Chromatographie sur SEPHADEX G 150 équilibré dans le tampon suivant :

	Déoxycholate de Na	0,5 %
	TrisHCl, pH 8.0	50 mM
30	DTT	5 mM (ou 2-mercapto- éthanol 1 %)
	EDTA	5 mM
	Aprotinine	100 U/ml
	PMSF	5 mM

35

3. Mise en évidence du pouvoir immunogène des fractions antigéniques selon l'invention.

Le pouvoir immunogène de LiUF2 a été mis en évidence dans les conditions suivantes.

5 Un groupe de 6 souris BALB/c, femelles, âgées de 9 semaines au début de l'expérience, a été immunisé à trois reprises, à 14 jours d'intervalle, par voie sous-cutanée avec 2 µg de LiUF2 (dose/souris/injection individuelle) associé à 50 µg de N-acétyl-muramyl L-alanine D-isogluta-

10 mine (MDP, Laboratoires CHOAY, Paris).
Un mois après la dernière immunisation, les souris immunisées et des séries témoins ont été infectées par 1.10^4 promastigotes de L. major (MRHO/SU/59/NealP), selon la désignation figurant dans le catalogue de l'Organisation Mondiale pour la Santé : OMS) inoculées par voie

15 intra-dermique à la racine de la queue.
Trente jours après le challenge infectieux, 1 souris sur 6 immunisée avec 3x2 µg de LiUF2, avait développé des lésions spécifiques (contrôles : 23/30).

20 Au 120ème jour post-infection, 27 des 30 souris témoins étaient infectées, alors que 5 des 6 souris du groupe immunisé avec LiUF2 se sont avérées être complètement protégées.

25 L'immunité de protection peut être mise en évidence en mettant en oeuvre les tests d'appréciation de l'immunoprotection élaborés ou appliqués par l'équipe à laquelle les inventeurs de la présente invention appartiennent et connus, par leurs publications, sous les désignations "test LRI" ou "test du type Winn" ("LRI-test, Winn-type-assay). Ils peuvent apporter une réponse soit

30 approximative (LRI-test), soit à moyen terme supérieure à 2 mois (Winn-type-assay), sur l'efficacité d'une vaccination anti-leishmanienne.

35 L'invention a également permis la mise au point d'une nouvelle épreuve d'évaluation de la protection

post-vaccinale, qui discrimine parfaitement la qualité de l'immunisation. La nouvelle méthode d'évaluation de l'immunoprotection est illustrée dans l'exemple II qui suit.

EXEMPLE II :

Les conditions de mise en oeuvre de la méthode d'évaluation de l'immunoprotection selon l'invention sont très proches de celles décrites dans l'exemple I, si ce n'est que les cellules mononucléées utilisées pour la production dans l'exemple I sont ici remplacées par des cellules mononucléées (2.10^5 macrophages ou monocytes) des sujets immunisés - ou de témoins.

Le mode d'obtention des monocytes, leur mise en adhérence en boîtes de Pétri et le protocole d'infection ultérieur par les formes promastigotes sont les mêmes, si ce n'est que l'opération d'incubation à 37°C, précédant l'infection par les promastigotes est avantageusement faite sur des boîtes dans lesquelles auront au préalable été ajoutées les mêmes, si ce n'est que l'opération 1 ml de RPMI contenant 5 % de sérum non décomplémenté des sujets vaccinés (ou des sujets sains, en ce qui concerne les témoins) - en lieu et place des 2 ml de RPMI additionné de 20 % de SVF utilisés au point 1.3 de l'exemple I.

L'infection ou non des macrophages-monocytes par les promastigotes est alors vérifiée 4 et 48 heures après le dépôt des parasites dans la culture cellulaire.

Si l'immunoprotection est acquise, aucune forme amastigote n'est observée dans les cellules colorées au May-Grunwald-Giemsa. Déposées secondairement en milieu de culture RPMI / SVF, l'effet protecteur est confirmé par l'absence de promastigotes après 7 jours.

En revanche, les monocytes-macrophages des sujets sains, non vaccinés ou mal vaccinés, renferment des dizaines d'amastigotes évoluant secondairement en promastigotes après mise en culture classique.

Ce protocole d'évaluation de l'immunoprotection est particulièrement avantageux pour l'exploration rapide du succès ou de l'échec d'une vaccination antileishmanienne.

REVENDICATIONS

1. Matériel biologique pour la production de vaccins anti-leishmaniens comprenant une population de leishmanies, caractérisé en ce que la totalité des leishmanies de cette population sont infectieuses à l'égard de cultures cellulaires normalement sensibles à l'égard de ces leishmanies.
2. Matériel biologique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par une culture de cellules infectées par lesdites leishmanies, le cas échéant congelées, lesdites cellules provenant normalement du même mammifère que le mammifère auquel les vaccins antileishmaniens sont destinés.
3. Matériel biologique selon la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites cellules sont des monocytes ou des macrophages.
4. Matériel biologique selon la revendication 1, caractérisé en ce que cette population de leishmanies est sous forme promastigote.
5. Matériel biologique selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comporte également un milieu acellulaire de culture ou de conservation pour ces parasites.
6. Procédé de production d'un matériel biologique pour la production de vaccins antileishmaniens, caractérisé par l'incubation d'une culture de cellules provenant normalement du même mammifère que le mammifère auquel les vaccins antileishmaniens sont destinés, notamment de macrophages ou de monocytes, en présence d'une population de leishmanies pathogènes à l'égard de ce mammifère dans des conditions et à une température, notamment de 37 à 39°C, autorisant l'infection des cellules de cette culture par ces leishmanies, la séparation du milieu de culture et le lavage des cellules pour assurer l'élimination de toutes leishmanies extracellulaires, la récupération des cellules contenant pratiquement exclusivement les cellules

infectieuses à l'égard du mammifère concerné, et l'amenée de ces cellules à une température, notamment par congélation, permettant la conservation des parasites infectieux.

5 7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé par la récupération des parasites, le cas échéant après un traitement de rupture ou de lyse des cellules, et par la mise en culture des parasites issus des cellules, dans des conditions et sous une température, notamment de l'ordre de 24°C, permettant leur multiplication à l'état promastigote.

10 8. Application des parasites leishmaniens à la production d'un vaccin antileishmanien par lyse des parasites et par récupération, à partir des lysats de ces parasites, de fractions de molécules dans des plages de poids moléculaires contenant des antigènes susceptibles
15 d'être reconnus par des anticorps monoclonaux antileishmania, eux-mêmes caractérisés par leur capacité à inhiber l'infection de cellules sarcomateuses par les formes promastigotes de une ou plusieurs espèces de Leishmania, lorsque ces cellules sarcomateuses sont mises en contact
20 avec lesdites formes promastigotes pré-incubées avec ces anticorps monoclonaux dans des conditions qui, en l'absence desdits anticorps monoclonaux, conduiraient à une parasitémie élevée dans lesdites cellules.

25 9. Application selon la revendication 8, caractérisée par la récupération des fractions de poids moléculaires contenus dans la plage de poids moléculaires de 94 à 67 kDa.

30 10. Application selon la revendication 8, caractérisée par la récupération des fractions de poids moléculaires contenus dans la plage de poids moléculaires de 20 à 30 kDa.

35 11. Application selon la revendication 8, caractérisée par la récupération des fractions de poids moléculaires contenus dans la plage de poids moléculaires

inférieurs à 20 kDa.

12. Procédé d'évaluation de l'efficacité d'une vaccination antileishmanienne chez un mammifère, caractérisé par la mise en contact avec des leishmanies infectieuses de cellules prélevées chez le mammifère vacciné, ces cellules étant choisies parmi celles, notamment macrophages ou monocytes, qui seraient sensibles à l'infection en cas de vaccination inefficace, dans des conditions et à une température qui autoriseraient normalement l'infection de ces cellules, et par la détection dans ces cellules de la présence d'une infection par lesdites leishmanies.

15

20

25

30

35